

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 特 許 公 報 (B 2)

(11)特許番号

特許第3059214号

(P3059214)

(45)発行日 平成12年7月4日(2000.7.4)

(24)登録日 平成12年4月21日(2000.4.21)

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I
C 1 2 N 15/00	Z N A	C 1 2 N 15/00
1/15		1/15
C 1 2 P 25/00		C 1 2 P 25/00
// (C 1 2 N 1/15		
C 1 2 R 1:645)		

請求項の数6(全 28 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願平3-510339
(86) (22)出願日	平成3年6月15日(1991.6.15)
(65)公表番号	特表平6-500007
(43)公表日	平成6年1月6日(1994.1.6)
(86)国際出願番号	P C T / E P 9 1 / 0 1 1 1 6
(87)国際公開番号	W O 9 2 / 0 0 3 7 9
(87)国際公開日	平成4年1月9日(1992.1.9)
審査請求日	平成10年3月13日(1998.3.13)
(31)優先権主張番号	P 4 0 2 0 1 8 1 . 3
(32)優先日	平成2年6月25日(1990.6.25)
(33)優先権主張国	ドイツ (D E)

(73)特許権者	999999999
	ピーエーエスエフ アクチエンゲゼルシ ャフト
	ドイツ連邦共和国 D-6700 ルートヴ ィヒス ハーフエン カールーボッシ ューストラーセ 38
(72)発明者	クルト, ローラント
	ドイツ連邦共和国 D-6703 リムブル ガーホーフ ヘルダーシュトラーセ 29
(72)発明者	フィリップセン, パーター
	ドイツ連邦共和国 D-6300 ギーセン ハインーヘックロートシュトラーセ 26
(74)代理人	999999999
	弁理士 矢野 敏雄 (外2名)

審査官 斎藤 真由美

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 新規のプロモーター領域

1

2

(57)【特許請求の範囲】	* * 【請求項1】配列No.1:	
AAGCTTGCCCT CGTCCCNCGC GGGTCACCCG GCCAGCGACA TGGAGGCCCA GATACCCCTCC		60
TTGACAGTCT TGACGTGCGC AGCTCACGGG GCATGATGTG ACTGTGCGCC GTACATTTAG		120
CCCATACATC CCCATGTATA ATCATTGTGA TCCATACATT TTGATGGCCG CGACGGGCGG		180
AAGCAAAAAT TACGGCTCCT CGCTGCAGAC CTGCGAGCAG GGA AACGCTC CCCTCAGCAG		240
ACGCGTTGAA TTCTCCCCAC GCGCGGCCCC TGTAGAGAAA TATAAAAGGT TAGGATTTGC		300
CACTGAGGTT CTTCTTTCAAT ATACTTCCTT TTA AAATCTT GCTAGGATAC AGTTCTCACA		360
TCACATCCGA ACATAAAACA AAATGGGTAA GGA AAAGACT CACGTTAAC		409

のヌクレオチド配列を有する、翻訳延長ファクターEF-
1 α をコードするA. ゴシピーー遺伝子のプロモーター領
域。

【請求項2】請求項1に記載のプロモーター領域で遺伝※

※子技術的に変更された真菌。

【請求項3】タンパク質の製造のために請求項2に記載
の真菌を使用する方法。

【請求項4】真菌はA. ゴシピーーである、請求項3に記載

の使用方法。

* * 【請求項5】 配列No.2:

GAATTCTCCC CACGGCGCGC CCCTGTAGAC AAATATAAAA GGTTAGGATT TGCCACTGAG	60
GTTCTTCTTT CATATACTTC CTTTAAAAAT CTTGCTAGGA TACAGTTCTC ACATCACATC	120
CGAACATAAA CAAAAATGGG TAAGGAAAAG ACTCACGTTA ACGTTGTCGT CATCGGTCAC	180
GTCGACTCTG GTAAGTCTAC TACCACCGGT CACTTGATCT ACAAGTGTGG TGGTATTGAC	240
AAGAGAACCA TCGAGAAGTT CGAGAAGGAG GCTGCCGAGT TGGGTAAGGG TTCTTTCAAG	300
TACGCCTGGG TTTTGGACAA ATTGAAGGCT GAGAGAGAGA GAGGTATCAC CATCGACATT	360
GCCTTGTTGA AGTTGAGAC TCCAAAGTAC CACGTCCTG TCATTGACCC CCCAGGCCAC	420
AGAGACTTCA TCAAGAACAT GATTACCGGT ACTTCTCAAG CTGACTGTGC CATCTTGATC	480
ATTGCTGGTG GTGTCGGTGA GTTCGAGGCT GGTATCTCCA AGGACGGTCA GACCAGAGAG	540
CACGCTTTGT TGGCTTACAC CTTGGGTGTC AAGCAGTTGA TCGTTGCCAT CAACAAGATG	600
GACTCCGTCA AGTGGGACGA GTCCAGATAC CAGGAGATTG TCAAGGAGAC CTCCAACCTC	660
ATCAAGAAGG TCGGTTACAA CCCTAAGACT GTTCCATTG TTCCAATCTC CGGCTGGAAC	720
GGTGACAACA TGATTGAGGC CACCACCAAC GCCCATGGT ACAAGGGCTG GGAGAAGGAG	780
ACCAAGGCTG GTGCCGTCAA GGGTAAGACC TTGTTGGAGG CCATTGACGC CATTGAGCCA	840
CCTGTCAGAC CAACTGACAA GGCATTGAGA TTGCCATTGC AGGATGTCTA CAAGATCGGT	900

5	GGTATTGGTA CGGTTCCAGT CGGCAGAGTC GAGACCGGTG TCATCAAGCC AGGTATGGTT	6	960
	GTTACCTTCG CCCCATCCGG TGTCACCACT GAAGTCAAGT CCGTCGAGAT GCACCACGAG		1020
	CAATTGGAGG AGGGTGTCCC AGGTGACAAC GTTGGTTTCA ACGTCAAGAA CGTCTCCGTC		1080
	AAGGAGATCA GAAGAGGTAA CGTTTGCGGT GACTCCAAGA ACGACCCACC AAAGGCTGCT		1140
	GAGTCCCTCA ACGCTACCGT CATGTCTTGT AACCAACCAG GTCAAATCTC TGCCGGTTAC		1200
	TCTCCAGTCT TGGACTGTCA CACTGCCCAC ATTGCTTGTA AGTTCGACGA GTTGTGGAG		1260
	AAGAACGACA GAAGAACCGG TAAGAAGTTG GAAGACTCTC CAAAGTTCCT AAAGGCCGGT		1320
	GACGCTGCCA TGGTCAAGTT TGTCCCATCC AAGCCAATGT GTGTTGAGGC TTTCACCGAC		1380
	TACCCACCAT TGGGTAGATT CGCTGTCAGA GACATGAGAC AGACCGTTGC TGTCGGTGTC		1440
	ATCAAGTCTG TTGTCAAGTC CGACAAGGCT GGTAAGGTCA CCAAGGCCGC CCAAAAGGCT		1500
	GGTAAGAAAT AGAGTAACTG ACAATAAAAA GATTCTTGTT TTCAAGAACT TGTCATTTGT		1560
	ATAGTTTTTT TATATTGTAG TTGTTCTATT TTAATCAAAT GTTAGCGTGA TTTATATTTT		1620
	TTTTGCCTCG ACATCATCTG CCCAGATGCG AAGTTAAGTG CGCAGAAAGT AATATCATGC		1680
	GTCAATCGTA TGTGAATGCT GGTGCTATA CTGCTGTGCA TTCGATACTA ACGCCGCCAT		1740
	CCAGTGCTTA CCTGTCAAAT TTGCCAGCGT CAAATGCCTC CAGGATAGAA TATGCTCGAC		1800
	AACTGTTGAA GTCCATCAAC AAGGATAACC CATATGCTCT ATCGGCCGAG AAAACGTTGC		1860
	CAGAGCCGCT TCCTTCCGCA GACGTGCCCC TTCCACTGCT AGATGAGAAG TACGGGGTAG		1920
	TTAGTGTTTC CAGGCCTCGT AAATGCCGCA ATAAATGCTT CCTTGGGTTC GCTACGCCAT		1980
	CTCAGGCAGA CGAGTTTCTA CAAAACCTCA AGGACCGCCT TTTCATATAT GGCCACCAGG		2040
	TCAATATAGA GCCAGCGAAG CATGATGCAT TCTGGTATAT TGAACGCGAG GATCC		2095

中の位置1513-2095に記載のヌクレオチド配列を有し、短縮された末端領域がなお機能的に有効であることを前提として、3'-末端で短縮されていてよい、翻訳延長ファクターEF- α をコードするA.ゴシピー遺伝子のターミネーター領域。

【請求項6】ビタミンB₂-生合成の遺伝子又はビタミンB₂の過剰発現に関与する遺伝子の構造的に強化された発現のために請求項2に記載の真菌を使用する方法。

【発明の詳細な説明】

本発明は、アシビヤ・ゴシピー (*Ashbya gossypii*) からのプロモーター領域、このプロモーター領域で遺伝的に変えられた菌類及びその使用に関する。

A.ゴシピーは、ビタミンB₂の発酵的生産に使用される。タンパク質産物の生産によるA.ゴシピーのための発酵工学の使用を遺伝子工学の方法の使用下に拡大することは望ましいことである。この目的のためにA.ゴシピーについての表現系が必要とされる。若干の高等子囊菌類、例えばアスペルギルス・ニゲル (*Aspergillus niger*) について、そのような系がすでに記載された (Rambossek及びLeach, *CRC Critical Reviews in Biotechnology* 6 (1987)、357-393)。それに対して、その属

30 * の唯一の代表である半子囊菌類 (Hemiascomyceten)、A.ゴシピーでの遺伝子工学分野上の経験は今までに無い。

所望の生産物についてコードする遺伝子の発現のための系の基本的成分は、いわゆるプロモーター領域であり、これは

- 1) 遺伝子の転写のためにはならない機能的プロモーターから、かつ
- 2) mRNAにおける転写後に翻訳のために必要である5'非コード化領域 (プロモーター及び翻訳開始の間) から成る。

本発明の目的は、翻訳延長因子EF-1 α (=TEF-1 α) をコードするA.ゴシピー-TEF-遺伝子のプロモーター領域である。

この遺伝子は極めて強力に発現され、従って極めて有効なプロモーター領域を有する。

本発明により得られるプロモーター領域は、配列-記録No.1に示されたヌクレオチド配列を有する。転写及び翻訳の開始のための能力を有する新規のかつ配列決定されたプロモーター領域の機能範囲を、3'-末端では良好にかつ5'-末端ではあまり良好ではなく制限するこ

とができるので、A. ゴシビィー遺伝子の自然のプロモーター領域は、その長さで容易に挙げられた配列からはずされることは除外することはできない。

本発明のもう1つの目的は、翻訳延長因子EF-1 α (=TEF-1 α) をコードするA. ゴシビィーTEF-遺伝子のターミネーター領域である。

このターミネーター領域は、有効な転写停止のために使用されうる。

本発明により得られるターミネーター領域は、配列-記録No.2、位置1513-2095に所定のヌクレオチド配列を有する。この配列の3'-末端短縮も転写ターミネーターとして考慮される。

ターミネーターの領域は、TEF-プロモーター領域又は他の同種又は異種のプロモーターと関連して使用され得る。

更に本発明の目的は、前記のプロモーター領域又はその一部及び/又は前記のターミネーター領域又はその一部を有する菌類である。

プロモーター領域は、特に次の菌類中に挿入され得る：アシビヤ・ゴシビィ、アシビヤと近縁の種類、例えば特にエルモテシウム・アシビィ (*Eremothecium as-hbyi*) 及びアシビヤとは類縁ではない属、例えば特にアスペルギルス (*Aspergillus*) 及びノイロスポラ (*Neurospora*)。

新規のプロモーター領域は、

- 隣接するDNA-配列を含むA. ゴシビィからの翻訳延長因子EF-1 α のための遺伝子 (TEF-遺伝子) のクローニング及び引続いての分離により、
- A. ゴシビィ中で選択可能なプロモーター欠失遺伝子の解放読み枠 (offenes Leseraster) へのA. ゴシビィ-DNA-フラグメントの融合、強い表現性の形質転換体の単離及び次のTEF-プロモーターの選択により、
- 公知方法による化学的合成により製造することができる。

新規のプロモーター領域は、適当なベクター系と一緒に、A. ゴシビィ及び他の菌類中で同種及び異種のタンパク質を過剰発現させる可能性を開示する。その際、例えばビタミンB₂-生合成の遺伝子並びにビタミンB₂の過剰生産に責任のある構造的に強化された遺伝子の発現又は経済的に重要であるタンパク質の過剰発現及び単離が問題でありうる。更に新規のプロモーター領域を用いて、場合によっては他の菌類とは異なっているA. ゴシビィの転写後の変性ポテンシャル (例えばグリコシル化 (Glykosylierung)) が利用することができる。従来使用された形、例えばアスペルギルス又はサッカロミセス (*Saccharomyces*) により全ての異種タンパク質が十分な量で製造され得るわけではないので、新規の宿主主体 (この場合例えばA. ゴシビィ) のための効果的TEF-プロモーター領域を有する表現系の開発が極めて重要である。

例

1. アシビヤ・ゴシビィ-TEF-遺伝子の単離

A. ゴシビィ-ミセルから単離されたDNAを、制限エンドヌクレアーゼEcoR I及びBamH Iを用いて切断した。TEF-遺伝子又はその一部を有するDNA-フラグメントを、制限フラグメントのサイズ分けの後に、アガロースゲル電気泳動法及び引続く³²P-標識化の異種TEF-遺伝子試料とのハイブリド形成により同定した。TEF-遺伝子試料は、S. セレビジアエ (*Cerevisiae*) TEF2-遺伝子の1377bp長さの開放読み枠のヌクレオチド363-1235を包含する (Schirmaier及びPhilippsen, EMBOJ.3 (1984), 3311-3315)。4.6kb長さのEcoR I-フラグメント及び6.4kb長さのBamH I-フラグメントを、異種TEF-遺伝子試料と、ハイブリド形成させた。この長さ範囲のフラグメントをアガロースゲルから溶離させ、EcoR IもしくはBamH Iで切断されたベクターpUC8 (Vieira及びMessing, Gene19 (1982) 259-268) 中でクローニングし、かつE.coli中に形質転換させた。TEF-DNAを有するクローンは、³²P-標識化の異種試料とのコロニーハイブリド形成 (Grunstein及びHogness, Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.72 (1975), 3961-3965) により認識された。陽性クローンは、4.6kb長さのEcoR I-フラグメント又は6.4kb長さのBamH I-フラグメントを有した。両クローンは、2.1kbの範囲で重なり、これはTEF-遺伝子試料への相同を有しかつそれは配列決定された (配列No.2)。この2.1kb長さのフラグメントは、1377bpの開放読み枠、5'-非コード化領域の136bp及び3'-非コード化領域の582bpを有する。EcoR I-切断部位を過ぎてその先のHind III-切断部位までの5'-非コード化領域の278bpが測定された、引続きプロモーター領域を、出発コドンの前の379bpのほかに更にTEF-遺伝子の開放読み枠の最初の24bpを有する403bp長さのHind III/Hinc II-フラグメントとして単離し、かつpAG-100及びpAG-101の構築のために使用した (配列No.1)。

2. プラスミド構築

a) ベクターpAG-1 (第1図) (寄託DSM6010)、ベクターpEX4の誘導体を、Ernst及びChan, J.Bacteriol.163 (1985) 8-14によって製造した。pAG-1は、アミノグリコシドホスホトランスフェラーゼ (APH (3') I) に関してコードするトランスポゾンTn903のカナマイシン耐性遺伝子を有する1.7kb Sal I-フラグメントを含有する。最初のpEX4-構築体中で、まずTn903の1695bp Pvu II-フラグメント (Okazaki等, J.Mol.Biol.147 (1981), 217-226) を、補充されたSal I-切断部位を有するプラスミド中に連結させた。その際、Sal I-切断部位は保持されたままであり、かつ耐性遺伝子は、1.7kb Sal I断片として単離され得る。pAG-1はサッカロミセス・セレビジアエ、ARS-エレメントARS1及び2 μ ARSを含有し、かつアシビヤゴシビィ中に自発的に複製する (repliziert)。

b) pAG-2 (第2図)。カナマイシン耐性遺伝子を

有する1.7kb Sal I-フラグメントをpAG-1から切断し、かつS.セルビジアエのSal I切断部位に、E.coliシヤトルベクターXEp24 (Botstein等、Gene8 (1979)、17-24; New England Biolabs Inc., Beverly, MA, USA, 1988-1989 Catalog, 112-113) を挿入した。新たに生じたプラスミド-pAG-2-の構造を、制限酵素切断地図作製によって調べ、この際1.7kb Sal I-フラグメント中にあるXho I-切断部位を、挿入配向の調査に使用した。pAG-2は、サッカロミセス・セルビジアエARS-エレメント2μARSを含有し、かつアシビヤ・ゴシビィ中に自発的に複製された。

c) pAG-100 (第3図)。3'-方向でカナマイシン、耐性遺伝子の翻訳出発の後の30bpにあるpAG-2のXho I切断部位に、プロモーター領域及びA.ゴシビィからの翻訳延長因子EF-1αのための遺伝子 (TEF-遺伝子) の開放読み枠の最初の24bpを含有する403bp長さのHind III/Hinc II-フラグメントを、突出末端の相補後に挿入した。こうして生じたプラスミドpAG-100中のフラグメントの配向を、制限酵素切断地図作製によってHind IIIで調べた。403bp長さのフラグメントの挿入によって、APH (3') Iの10N-末端アミノ酸をA.ゴシビィ翻訳延長因子EF-1αの最初の8アミノ酸に代えた。他のアミノ酸によるAPH (3') Iの最初の19アミノ酸の除去又は交換は、活性の損失に結びつかない (Chen及びFukuhara, Gene69 (1988)、181-192)。TEF-プロモーター領域の挿入後のSal I-フラグメントの配列は、配列No.2に示す。pAG-100は、サッカロミセス・セルビジアエARS-エレメント2μARSを含有し、かつアシビヤ・ゴシビィ中に自発的に複製する

d) pAG-5 (第4図)。pAG-1からのカナマイシン耐性遺伝子を有する1.7kbフラグメントを、pBR322 (Bolivar等、Gene2 (1977) 95-113) のSal I-切断部位にサブクローン化した。生じたプラスミド-pJL3A-は、pBR322-成分中に各々1個のBamH I-及び1個のEcoR I-切断部位を有し、従ってpJL3Aは、二重消化 (Doppelverdau) によって375bp及び5688bpフラグメントに分解される。大きなフラグメントを、翻訳延長因子EF-1α (TEF-遺伝子) に関する遺伝子の開放読み枠を含有する (配列No.1) 2.1kb EcoR I/BamH I A.ゴシビィフラグメントと連結させた。生じたプラスミドを、pAG-5と表示した。pAG-5は、サッカロミセス・セルビジアエARS-エレメントを含有しない。

e) pAG-101 (第5図)。カナマイシン耐性遺伝子の開放読み枠中にあるXho I切断部位中に、pAG-100の構築のために記載したように、プロモーター領域及びA.ゴシビィからのTEF-遺伝子の開放読み枠の最初の24bpを有する403bp Hind III/Hinc II-フラグメントを挿入した。そうして生じたプラスミドを、pAG-101と表示した。pAG-101は、サッカロミセス・セルビジアエARS-エレメントを含有しない。

f) pBKS1871 (TEF-プロモーター-lacZ-融合のための前駆プラスミド) : プラスミドpBKS⁺ (Short等、Nucleic Acid. Res., 16 (1988)、7583-7600) のPst I切断部位中に、プラスミドpMC1871 (Shapira等、Gene, 25 (1983)、71-82) からの3113bp長さのPst Iフラグメントをクローン化した。このフラグメントは、最初の7コドンが欠けているE.coli (Kalnins等、EMBO J., 2 (1983)、593-597) からのlacZ-遺伝子の開放読み枠を有する。

10 g) pPL1 (第6図)。pBKS1871をlacZ-遺伝子の前のSma I切断部位で線状にした。線状化されたプラスミド中に、TEF-プロモーター及びA.ゴシビィからのTEF-遺伝子の最初の8コドンを含む隣接配列を有する1500bp Hinc II-フラグメントをクローン化挿入 (einkloniert) させた。それによって、β-ガラクトシダーゼに関してコード化し、その最初の7アミノ酸がA.ゴシビィからのEF-1αの最初の8アミノ酸に代えられている開放読み枠が生じた。このプラスミドから、TEF-プロモーターの種々の長さの範囲を有するTEF-プロモーター-lacZ-融合を単離することができた。

h) pPL2 (第9図)。pBKS1871をlacZ-遺伝子の前のSma I-切断部位で線状にした。線状化されたプラスミド中に、TEF-プロモーター (270bp) の一部並びにA.ゴシビィからのTEF-遺伝子の最初の8コドンを有する (24bp) 294bp長さのRsa I/Hinc II-フラグメントをクローン化挿入させた。

i) pPL3 (第10図)。pBKS1871をlacZ-遺伝子の前のSma I-切断部位で線状にした。線状化されたプラスミド中に、TEF-遺伝子 (24bp) の最初の8コドン及び5'-方向で翻訳されなかった領域の出発コドンの前にある範囲の215bpを有する239bp長さのHae III/フラグメントをクローン化挿入した。

j) pPL4 (第11図)。pBKS1871をlacZ-遺伝子の前のSma I-切断部位で線状にした。この線状化されたプラスミド中に、TEF-遺伝子の最初の8コドン及び5'-方向で翻訳されなかった領域の出発コドンの前にある範囲の134bpを有する158bp長さのEcoR I/Hinc II-フラグメントをクローン化挿入した。

k) pAG-110 (第7図)。Xba I及びSal IでpPL1の切断することによって、1500bp長さのTEF-プロモーターフラグメントとlacZ遺伝子との融合を有する4600bpフラグメントを単離した。このフラグメントを、突出末端の補充後に、pAG-100の補充されたBamH I切断部位にクローン化挿入した。

1) pAG-111 (第8図)。Hind IIIでpPL1を分離することによって、3509bp長さのフラグメントを単離した。このフラグメント中で、TEF-プロモーター領域は約1100bp短くされている。従ってこれは、pAG-100、pAG-101、pAG-110及びpAG-111中でG418耐性遺伝子の転写を制御するプロモーター領域に相応する。突出末端の補充

1 1

後に、3509bp長さのフラグメントをpAG-100の相補されたBamH I切断部位中にクローン化挿入した。

m) pAG-112 (第12図)。Xba I及びSal IでpPL2を分断した後に、294bp長さのプロモーターフラグメントとlacZ-遺伝子との融合を有する3392bp長さのフラグメントを単離し、かつ突出末端の補充後にプラスミドpAG-100の補充されたBamH I-フラグメント中に装入した。

n) pAG-113 (第13図)。Xba I及びSal IでpPL3を分断した後に、239bp長さのプロモーターフラグメントとlacZ-遺伝子との融合を有する3337bp長さのフラグメントを単離し、かつ突出末端の補充後に、プラスミドpAG-100の補充されたBamH I-切断部位中に装入した。

o) pAG-114 (第14図)。Hind IIIでpPL4を分断した後に、158bp長さのプロモーターフラグメントとlacZ-遺伝子との融合を有する3273bp長さのフラグメントを単離し、かつ突出末端の補充後にプラスミドpAG-100の補充されたBamH I-切断部位中に装入した。

p) pAG-115 (第15図)。BamH IでpBKS1871を分断した後に、lacZ-遺伝子の開放読み枠を有する3069bp長さのフラグメントを単離し、この際開放読み枠の最初の7コドンは無くかつ開放読み枠の前のプロモーターフラグメントはどれも融合されなかった。このフラグメントをプラスミドpAG-100のBamH I-切断部位に挿入した。

q) pAG-120。pB II KS- (Short等、Nucleic Acid Res.16 (1988)、7583-7600)をSsp I及びSca Iで分断し、かつ2084bp長さのフラグメントを単離した。YEP24 (Botstein等、Gene8 (1979)、17-24)をSca I及びCla Iで分断し、かつ2782bp大きさのフラグメントを単離した。これを突出末端の補充後に、pB II KS-からの2084bp長さのSca I/Ssp I-フラグメントと連結させ、従って再び完全なアンピシリン耐性遺伝子が生じた (Sca IはpB II KS-でかつYEP24はアンピシリン耐性遺伝子で切断する)。

r) pAG-121。pAG-100をSal I及びHind IIIで切断し、かつG418-耐性遺伝子の一部を有する669bp長さのフラグメントを単離する。これをSal I/Hind IIIで切断されたプラスミドpB II KS+ (Short等、Nucleic Acid Res.16 (1988)、7583-7600)中にクローン化挿入した。

s) pAG-122。pAG-100をHind IIIで切断し、かつTEF-プロモーターの制御下でG418-耐性遺伝子の一部を有する940bp長さのフラグメントを単離する。これをHind IIIで切断されたプラスミドpAG-121中に、完全なG418-耐性遺伝子が生じるように、挿入した。このプラスミドのE.coliにおける形質転換は、カナマイシン含有培地上での形質転換体選択を許す。

t) pAG-123。pAG-122をSal I及びBamH Iで切断し、かつTEF-プロモーターの制御下にG418-耐性遺伝子を有する1639bp長さのフラグメントを単離した。これをSca Iで切断されたプラスミドpAG-120中に挿入し、それ

1 2

によってカナマイシン含有培地上でのE.coli形質転換体の選択が可能とされた。

u) pAG-130。pB II KS+ (Short等、Nucleic Acid Res.16 (1988)、7583-7600)をHind III及びHinc IIで分断し、かつ403bp長さのHind III/Hinc II-TEF-プロモーターフラグメントを挿入した。

v) pAG-131。ゲノムのA.gossypii DNAの2.1kbの大きさのフラグメントを有し、その上にTEF-遺伝子を含有しているクローンから、TEF-遺伝子の3'-末端の25ヌクレオチド並びに3'-方向でそれに続く範囲を有する (ターミネーターフラグメント) 260bp大きさのHae I II/Acc I-フラグメントを単離した。このフラグメントを突出末端の補充後に、Hinc IIで分断されたプラスミドpB II KS- (Short等、Nucleic Acid Res.16 (1988)、7583-7600)中に挿入した。

w) pAG-132。pAG-130をSca I及びXho Iで切断し、かつ2248bp大きさのフラグメントを単離した。pAG-131を同様にSca I及びXho Iで分断し、かつ1442bp大きさのフラグメントを単離し、これを新たに完全なアンピシリン耐性遺伝子が生じるようにpAG-103からの2248bpフラグメントと連結させた。

x) M13PT。pAG-132をBamH Iで分離し、かつTEF-プロモーター及びTEF-ターミネーターフラグメントからの融合を含有する752bp大きさのフラグメントを単離した。これをM13mp9のBamH I-切断部位にクローン挿入した。

y) M13PT1、M13T2、M13T3。

M13PTを、オリゴヌクレオチド指向の突然変異 (Kramer等、NucL.Acid Res.24 (1984)、9441-9556)により、TEF-遺伝子の停止コドンの後で (ターミネーターフラグメント中)、Sca I-切断部位を、かつTEF-遺伝子の出発コドン中で (プロモーターフラグメント中)、Nco I-切断部位 (M13PT1)、Nsi I-切断部位 (M13PT2) 又はSph I-切断部位 (M13PT3) が産生されるように変換させた (第17図)。

z) pAG-201。pAG-202 pAG-203 (第18図)

M13PT1、M13PT2及びM13PT3をBamH Iで分断し、かつ分断体からTEF-遺伝子のプロモーター及びターミネーター領域を有する751bp大きさのフラグメントを単離した。このTEF-シグナル配列をプラスミドpAG-123のBamH I-切断部位中に挿入し、かつプラスミドpAG-201を得た。同じ方法により、M13PT2からプラスミドpAG-202を、かつM13PT3からプラスミドpAG-203を構築させた。3. TEF-プロモーター領域-プラスミドでのAGゴシビの形質転換

形質転換は、次の概要により行なった:

- MA2 (200ml) に胞子約 $1 - 2 \times 10^7$ を接種する、
- 32-40時間27°Cで350rpmでシカネンフラスコ (Schikanebolben) 中で培養する、
- ミセルを吸引濾過で濾取し、かつH₂O30ml中で1x洗浄す

る、
 - 未乾燥重量 (Frischgewicht) を測定する (約 2-3 g)、
 - ミセルを SD30ml 中に懸濁させ、かつ 30 分間 30°C で振盪器中で培養する、
 - ミセルを未乾燥重量 1g 当り SPEZ5-10ml 中に懸濁させる、
 - 30°C で水浴振盪器中で培養し、プロトプラスト化を顕微鏡で調べる (30 分間後に 90% 以上のプロトプラスト化度が達成されているはずである)、
 - プロトプラスト懸濁液をガラス濾過器 (Schott、有孔率 1) を通して濾過する、
 - 濾液を 5 分間遠心分離する (Sorvall SM24Rotor、1800Upm)、
 - 沈殿を ST20ml 中で 1x 及び STC20ml 中で 1x 洗浄する、
 - プロトプラストを STC20ml 中に懸濁させかつ力価 (Titer) を計算室で測定する、
 - プロトプラストを遠心分離後に STC 中に 4×10^8 /ml の濃度に再懸濁させる、
 - プロトプラスト懸濁液 100 μ l を TE 最高 15 μ l 中の DNA に加えかつ混合する、(DNA-量: 複製 TEF-プロモーター領域-プラスミドのために: 1-10 μ g; 線状化の TEF-プロモーター領域-プラスミドのために: 15-20 μ g)、
 - 15 分間室温で培養する、
 - 慎重に PTC40 (1ml) を加えかつ転回混合する、
 - 5 分間遠心分離 (Heraeus Biofuge A. 1500Upm)、
 - 上澄液を慎重に除去しかつ沈殿を SMTCI (1ml) 中に懸濁させる、
 - 3 時間 27°C で培養し、約全 45 分間転回により混合する、
 - 遠心分離後に沈殿を SM1ml 中に懸濁させる、
 - 懸濁液を SMA2 上層 (Toplayer) 9ml と混合しかつ SMA2 平板培地上に加える (1 平板培地当り SMA2-寒天 20ml)、
 - 平板培地を 18 時間 27°C で培養、
 - 平板培地に G418 を被層する (G418 原液 0.54ml + H₂O 0.46ml + 0.5% アガロース 6ml (H₂O 中、42°C に予備加熱))、
 - 平板培地を 27°C で更に培養し、形質転換は複製プラスミドで 2-3 日後に、組み込み時に 3-6 日後に可視可能である

培地及び溶液

培地: MA2: ペプトン (Gibco カゼイン加水分解物、No. 140): 10g/l
 酵母エキス (Gibco): 1g/l
 ブドウ糖 10g/l
 ミオ-イノシトール 0.3g/l
 SMA2-寒天: ソルビトール: 1M
 ペプトン: 10g/l
 酵母エキス: 1g/l
 ブドウ糖: 20g/l
 ミオ-イノシトール 0.3g/l
 寒天 (Gibco) 12g/l
 SMA2-上層: SMA2-寒天と同様、寒天の代わりに 0.8% アガロース
 溶液: SD: ソルビトール 1M; ジチオトレイトール 50mM
 SPEZ: ソルビトール 1M; Na-ホスフェート緩衝液 pH5.8 (10mM); EDTA 10mM; チモリエーゼ (Zymolyase) 20T2mg/ml (Seikagaku Kogyo Co. Tokyo)
 ST: ソルビトール 1M; トリス-C1pH8 (10mM)
 STC: ソルビトール 1M; トリス-C1pH8 (10mM); CaCl₂ 10mM
 TE: トリス-C110mM; EDTA 1mM
 PTC40: ポリエチレングリコール 4000 (Merck) 40% (w/v); トリス-C1pH8 (10mM); CaCl₂ 10mM
 SMTCI: SM (下記参照) 50%; STC 50%; ミオ-イノシトール 0.03g/l
 SM: ソルビトール 50% 2M; MA2 50%
 G418-原液: H₂O 中 G418 (Geneticin Gibco) 20mg/ml
 4. TEF-プロモーター領域プラスミドでの形質転換結果
 例 3 により実施された種々の形質転換の結果を第 1 表にまとめる。全実験において形質転換体は、形質転換平板培地当り G418-濃度 0.3mg/ml で選択した。この G418-濃度では、A. ゴシビィ ミセルの増殖は完全に阻止される。組換え DNA-ベクター pAG-1 及び pAG-2 での形質転換では (この際 G418-耐性遺伝子は最初の細菌プロモーターの制御下にありかつ TEF-プロモーター領域の制御下でない)、この濃度では形質転換体は生じなかった。この組換え DNA-ベクターで形質転換体を得るためには、形質転換平板培地当り G418-濃度 0.1mg/ml を越えてはならない。この濃度では、出現するコロニーの 80% までが形質転換体ではない。

第1表：形質転換結果

実験	プラスミド	形質転換体当りの DNA、 μg	DNA1 μg 当りの 形質転換体	生育可能なプロトプラ スト当りの形質転換体
1	pAG-1	10	0	0
1	pAG-2	10	0	0
1	pAG-100	10	10	1.2×10^{-4}
2	pAG-100	0.1	10	1.6×10^{-5}
3	pAG-100	1	3	3.4×10^{-4}
3	pAG-100	20	0.05	1.1×10^{-5}

BamHIで線状化

5. lacZ-プラスミドでの形質転換結果

TEF-プロモーター機能性を更に調べるために、E.coliからの β -ガラクトシダーゼのための遺伝子(lacZ-遺伝子)がTEF-プロモーターの制御下にあるプラスミドpAG-100の誘導体を構築した。このために、TEF-遺

* 伝子のプロモーター領域の種々の範囲をlacZ-遺伝子の開放読み枠前で融合させ、この際、lacZ-遺伝子の最初の7コドンはTEF-遺伝子の最初の8コドンに代えられた。プラスミドpAG-110はlacZ-遺伝子の前で約1.5kb長さのHinc II TEF-プロモーターフラグメントを有

17

し、かつプラスミドpAG-111は403bp長さのHind III/Hinc II-TEF-プロモーターフラグメントを有し、これはすでにpAG-100及びpAG-101の構築のために使用された。プラスミドpAG-112は294bp長さのTEF-プロモーターフラグメントを有し、プラスミドpAG-113は、239bp長さのTEF-プロモーターフラグメントを有しかつpAG-114は158bp長さのTEF-プロモーターフラグメントを有する。

付加的に、対照プラスミドとして、プロモーターフラグメントの融合なしにlacZ-遺伝子の開放読み枠を有するpAG-115を構築した。

A. ゴシピィにおけるこのプラスミドの形質転換後に、lacZ-遺伝子の発現を発色試験により検査した。lacZ-遺伝子によってコードされたβ-ガラクトシダーゼは、青色染料5-ブロム-4-クロルーインジゴ中で、X-Gal (5-ブロム-4-クロルー3-インドイル-β-D-ガラクトシド) を分解する。pAG-110-、pAG-111-及びpAG-112-形質転換体は、X-Gal (Miller, Experiments in Molecular Genetics, Cold Spring Harbor, New York 1972, 48) を濃度100μg/mlで含有する培地上に青色のコロニーを形成した。pAG-113、pAG-114又はpAG-115を含有する形質転換体では、青色呈色は見られなかった。

lacZ-遺伝子の前で融合された種々のTEF-プロモーターフラグメントについての概要を第16図に示す。+はX-Gal-含有培地上のコロニーの青色呈色を表わし、-は可能可能な青色呈色が無いことを表わす。

18

β-ガラクトシダーゼ発現のもう1つの検査のために、pAG-110-、pAG-111-、pAG-112-、pAG-113-、pAG-114-及びpAG-115-形質転換体の液体培地からのβ-ガラクトシダーゼ活性を測定した。このためにミセルをガラス球で破壊した(Rose, M.; Casadaban, M. J. and Botstein, D., Proc. Natl. Acad. Sci. USA Vol. 78, No. 4 (1981), 2460-2464)。G418200μg/mlを有するMA2-液体培地中で生育したミセル0.5gを、トリス0.1mM、pH8.0/グリセリン20% (vol/vol)/DTT 1mM/PMSF1mM中に入れかつガラス球(直径0.45-0.5mm)0.5gの添加後に-20°Cで凍結除去した。ミセルの破壊のために4°Cで15秒間12回激しく振盪した(ボルテックス)。引続き10000rpmで20分間2回遠心分離した(ソルバール(Sorball)冷却遠心分離機)。上澄液をZ-緩衝液(Na₂HPO₄0.06M/NaH₂PO₄0.04M/KCl0.01M/MgSO₄0.001M/β-メルカプトエタノール0.05M)中で、1:10もしくは1:20に希釈した。希釈されたタンパク質-粗製抽出液中でβ-ガラクトシダーゼ活性を、o-ニトロフェニル-β-D-ガラクトピラノシドの分解により測定した(Miller, Experiments in Molecular Genetics, Cold Spring Harbor, New York 1972, 353ff)。酵素活性を粗製抽出液中のタンパク質濃度に相対させ、これをブラッドフォード(Bradford)の方法により測定した(Bradford, M.M., Anal. Biochem. 72 (1976), 248-254)。β-ガラクトシダーゼ活性測定の結果を第2表に示す。1分間当り及び総タンパク質1mg当りに遊離されたo-ニトロフェノールの量が挙げられている(OD₄₂₀として測定)。

19

第2表： β -ガラクトシダーゼ発現

プラスミド	測定 No.	β -ガラクトシダーゼ活性 (相対単位、OD ₄₂₀ /7分)
pAG-110	1	3.62
	2	3.54
	3	2.45
pAG-111	1	3.07
	2	3.29
	3	3.63
	4	3.16
pAG-112	1	1.89
	2	1.90
	3	1.79
	4	1.75
pAG-113	1	0
	2	0
pAG-114	1	0
	2	0
pAG-115	1	0
	2	0

配列記録

No.1:

配列の種類:ヌクレオチド

配列の長さ:409塩基対

鎖形態:一本鎖

トポロジー:線状

分子の種類:ゲノム-DNA

由来:A.ゴシピィ

形質:プロモーター領域

AAGCTTGCCT	CGTCCCNCGC	GGGTCACCCG	GCCAGCGACA	TGGAGGCCCA	GATACCCTCC	60
TTGACAGTCT	TGACGTGGC	AGCTACGGG	GCATGATGTG	ACTGTCGCC	GTACATTTAG	120
CCCATACATC	CCCATGTATA	ATCATTTGCA	TCCATACATT	TTGATGGCCG	CGACGGCGCG	180
AAGCAAAAAT	TACGGCTCCT	CGCTGCAGAC	CTGCGAGCAG	GGAAACGCTC	CCCTCAGCAG	240 ²¹
ACGCGTTGAA	TTCTCCCCAC	GGCGGCCCCC	TGTAGAGAAA	TATAAAAGGT	TAGGATTTGC	300
CACTGAGGTT	CTTCTTTTCAT	ATACTTCCTT	TTAAAATCTT	GCTAGGATAC	AGTTCTCACA	360
TCACATCCGA	ACATAAACAA	AAATGGGTAA	GGAAAAGACT	CACGTTAAC		409

(1 1)

特許第3059214号

10

20

30

40

TEF 遺伝子の開放読み枠を有する 2.1 kb ECORI/BamHI 断片の配列

GAATTCCTCCC CACGGCGCGC CCCTGTAGAC AAATATAAAA GGTTAGGATT TGCCACTGAG	60
GTTCTTCTTT CATATACTTC CTTTAAAAAT CTTGCTAGGA TACAGTTCTC ACATCACATC	120
CGAACATAAA CAAAAATGGG TAAGGAAAAG ACTCACGTTA ACGTTGTCTG CATCGGTCAC	180
GTCGACTCTG GTAAGTCTAC TACCACCGGT CACTTGATCT ACAAGTGTGG TGGTATTGAC	240
AAGAGAACCA TCGAGAAGTT CGAGAAGGAG GCTGCCGAGT TGGGTAAGGG TTCTTTCAAG	300
TACGCCIGGG TTTTGGACAA ATTGAAGGCT GAGAGAGAGA GAGGTATCAC CATCGACATT	360
GCGTTGTGGA AGTTCGAGAC TCCAAAGTAC CACGTCACTG TCATTGACCC CCCAGGCCAC	420
AGAGACTTCA TCAAGAACAT GATTACCGGT ACTTCTCAAG CTGACTGTGC CATCTTGATC	480
ATTGCTGGTG GTGTCGGTGA GTTCGAGGCT GGTATCTCCA AGGACGGTCA GACCAGAGAG	540
CACGCTTTGT TGGCTTACAC CTTGGGTGTC AAGCAGTTGA TCGTTGCCAT CAACAAGATG	600
GACTCCGTCA AGTGGGACGA GTCCAGATAC CAGGAGATTG TCAAGGAGAC CTCCAACCTC	660
ATCAAGAAGG TCGGTTACAA CCCTAAGACT GTTCCATTCG TTCCAATCTC CGGCTGGAAC	720
GGTGACAACA TGATTGAGGC CACCACCAAC GCCCCATGGT ACAAGGGCTG GGAGAAGGAG	780
ACCAAGGCTG GTGCCGTCAA GGGTAAGACC TTGTTGGAGG CCATTGACGC CATTGAGCCA	840
CCTGTCAGAC CAACTGACAA GGCATTGAGA TTGCCATTGC AGGATGTCTA CAAGATCGGT	900
GGTATTGGTA CGGTTCCAGT CGGCAGAGTC GAGACCGGTG TCATCAAGCC AGGTATGGTT	960
GTTACCTTCG CCCCATCCGG TGTCACCACT GAAGTCAAGT CCGTCGAGAT GCACCACGAG	1020
CAATTGGAGG AGGGTGTCCC AGGTGACAAC GTTGGTTTCA ACGTCAAGAA CGTCTCCGTC	1080
AAGGAGATCA GAAGAGGTAA CGTTTGCAGT GACTCCAAGA ACGACCCACC AAAGGCTGCT	1140
GAGTCCTTCA ACGCTACCGT CATTGTCTTG AACCACCCAG GTCAAATCTC TGCCGGTTAC	1200
TCTCCAGTCT TGGACTGTCA CACTGCCCAC ATTGCTTGTA AGTTCGACGA GTTGTGGAG	1260
AAGAACGACA GAAGAACCGG TAAGAAGTTG GAAGACTCTC CAAAGTTCCT AAAGGCCGGT	1320
GACGCTGCCA TGGTCAAGTT TGTCCCATCC AAGCCAATGT GTGTTGAGGC TTTCACCGAC	1380
TACCCACCAT TGGGTAGATT CGCTGTCAGA GACATGAGAC AGACCGTTGC TGTCGGTGTC	1440
ATCAAGTCTG TTGTCAAGTC CGACAAGGCT GGTAAGGTCA CCAAGGCCGC CAAAAGGCT	1500
GGTAAGAAAT AGAGTAACTG ACAATAAAAA GATTCTTGTT TTCAAGAAGT TGTCATTTGT	1560

No 2 (続き)

ATAGTTTTTT TATATTGTAG TTGTTCTATT TTAATCAAAT GTTAGCGTGA TTTATATTTT 1620
TTTTGCCCTCG ACATCATCTG CCCAGATGCG AAGTTAAGTG CGCAGAAAGT AATATCATGC 1680
GTCATATCGTA TGTGAATGCT GGTCGCTATA CTGCTGTGCA TTCGATACTA ACGCCGCCAT 1740
CCAGTGICTA CCTGTCAAAT TTGCCAGCGT CAAATGCCCTC CAGGATAGAA TATGCTCGAC 1800
AACTGTTGAA GTCCATCAAC AAGGATAACC CATATGCTCT ATCGGCGGAG AAAACGTTGC 1860
CAGAGCCGCT TCCTTCCGCA GACGTGCCCC TTCCACTGCT AGATGAGAAG TACGGGGTAG 1920
TTAGTGTTC CAGGCCTCGT AAATGCCGCA ATAAATGCTT CCTTGGGTTT GCTACGCCAT 1980
CTCAGGCAGA CGAGTTTCTA CAAAACITCA AGGACCGCCT TTTCATATAT GGCCACCAGG 2040
TCAATATAGA GCCAGCGAAG CATGATGCAT TCTGGTATAT TGAACGCGAG GATCC 2095

カナマイシン耐性遺伝子の配列 - TEF プロモーター領域 -
融合 (TEF プロモーター領域配列は下線を引いてある)

GTCGACTGTA ATCCGGGCAG CGCAACGGAA CATTTCATCAG TGTA AAAATG GAATCAATAA	60
AGCCCTGCGC AGCGCGCAGG GTCAGCCTGA ATACGCGTTT AATGACCAGC ACAGTCGTGA	120
TGGCAAGGTC AGAATAGCGC TGAGGTCTGC CTCGTGAAGA AGGTGTTGCT GACTCATACC	180
AGGCCTGAAT CGCCCCATCA TCCAGCCAGA AAGTGAGGGA GCCACGGTTG ATGAGAGCTT	240
TGTTGTAGGT GGACCAGTTG GTGATTTTGA ACTTTTGCTT TGCCACGGAA CGGTCTGCGT	300
TGTCGGGAAG ATGCGTGATC TGATCCTTCA ACTCAGCAA AGTTCGATTT ATTCAACAA	360
GCCACGTTGT GTCTCAAAAT CTCTGATGTT ACATTGCACA AGATAAAAAT ATATCATCAT	420
GAACAATAAA ACTGTCTGCT TACATAAACA GTAATACAAG GGGTGTATG AGCCATATTC	480
AACGGGAAAC GTCTTGCTCG <u>AAGCTTGCTT CGTCCCTCGC GGGTCACCCG GCCAGCGACA</u>	540
<u>TGGAGGCCCA GATACCTCC TTGACAGTCT TGACGTGCGC AGCTCACGGG GCATGATGTG</u>	600
<u>ACTGTGCCCC GTACATTTAG CCCATACATC CCCATGTATA ATCATTTGCA TCCATACATT</u>	660
<u>TTGATGGCCG CGACGGCGCG AAGCAAAAAT TACGGCTCCT CGCTGCAGAC CTGCGAGCAG</u>	720
<u>GGAAACGCTC CCCTCAGCAG ACGCGTTGAA TTCTCCCCAC GCGCGCCCC TGTAGAGAAA</u>	780
<u>TATAAAGGT TAGGATTGCT CACTGAGGTT CTTCTTTCAT ATACTTCCTT TTAATCTT</u>	840
<u>GCTAGGATAC AGTTCTCACA TCACATCCGA ACATAAACAA AAATGGGTAA GGAAAAGACT</u>	900
<u>CACGTTTCGA GGCCGCGATT AAATTCCAAC ATGGATGCTG ATTTATATGG GTATAAATGG</u>	960
GCTCGCGATA ATGTCGGGCA ATCAGGTGCG ACAATCTATC GATTGTATGG GAAGCCCGAT	1020
GCGCCAGAGT TGTTTCTGAA ACATGGCAA GGTAGCGTTG CCAATGATGT TACAGATGAG	1080
ATGGTCAGAC TAAACTGGCT GACGGAATTT ATGCTCTTTC CGACCATCAA GCATTTTATC	1140
CGTACTCCTG ATGATGCATG GTTACTCACC ACTGCGATCC CCGGGAAAAC AGCATTCCAG	1200
GTATTAGAAG AATATCCTGA TTCAGGTGAA AATATTGTTG ATGCGCTGGC AGTGTTCCTG	1260
CGCCGGTTGC ATTCGATTCC TGTTTGTAAT TGTCCTTTTA ACAGCGATCG CGTATTTCGT	1320
CTCGCTCAGG CCCAATCACC AATGAATAAC GGTGTTGGTTG ATGCGAGTGA TTTTGATGAC	1380
GAGCGTAATG GCTGGCCTGT TGAACAAGTC TGGAAAGAAA TGCATAAGCT TTTGCCATTG	1440
TCACCGGATT CAGTCGTCAC TCATGGTGAT TTCTCACTTG ATAACCTTAT TTTTGACGAG	1500
GGGAAATTAA TAGGTTGTAT TGATGTTGGA CGAGTCGGAA TCGCAGACCG ATACCAGGAT	1560
CTTGCCATCC TATGGAACCT CCTCGGTGAG TTTTCTCCTT CATTACAGAA ACGGCTTTTT	1620

No. 3 (続き)

1680 CAAAATATG GTATTGATAA TCCTGATATG AATAAATTGC AGTTTCATTT GATGCTCGAT
 1740 GAGTTTTTCT AATCAGAAAT GGTAAATTGG TTGTAACACT GGCAGAGCAT TACGCTGACT
 1800 TGACGGGACG GCGGCTTTGT TGAATAAATC GAACTTTTCG TGAGTTGAAG GATCAGATCA
 1860 CGCATCTTCC CGACAACGCA GACCGTTCCG TGGCAAAGCC AAAGTTCAAA ATCACCAACT
 1920 GGTCCACCTA CAACAAAGCT CTCATCAACC GTGGCTCCCT CACTTTCTGG CTGGATGATG
 1980 GGGCGATTCA GGCCTGGTAT GAGTCAGCAA CACCTTCTTC ACGAGGCAGA CCTCAGCGCT
 2040 ATTCTGACCT TGCCATCAGG ACTGTGCTGG TCATTAAACG CGTATTCAGG CTGACCCCTGC
 2100 GCGCTGCGCA GGGCTTTATT GATTCCATTT TTACACTGAT GAATGTTCCG TTGCGCTGCC
 2115 CGGATTACAG TCGAC

第1～8図の説明

第1図：プラスミドpAG-1。ARS:S.セレビジアエARS1配列;2ミクロン：複製開始点を有するS.セレビジアエ2 μ プラスミドのEcoR Iフラグメント;URA3:S.セレビジアエURA3遺伝子;G418r:G418（カナマイシン）耐性;閉鎖矢印:S.セレビジアエcycl-13プロモーター;ブラックボックス:S.セレビジアエcyclターミネーター;開放矢印は転写方向を示す。

第2図：プラスミドpAG-2。amp:アンピシリン耐性;2ミクロン：複製開始点を有するS.セレビジアエ2 μ プラスミドのEcoR Iフラグメント;URA3:S.セレビジアエURA3遺伝子;G418r:G418（カナマイシン）耐性;ORI:E.coliにおけるプラスミド複製のオリジン;開放矢印は転写方向を示す。

第3図：プラスミドpAG-100。amp:アンピシリン耐性;2*50

*ミクロン：複製開始点を有するS.セレビジアエ2 μ プラスミドのEcoR Iフラグメント;URA3:S.セレビジアエURA3遺伝子;G418r:G418（カナマイシン）耐性;ORI:E.coliにおけるプラスミド複製のオリジン;閉鎖矢印:TEF-プロモーター領域を有するA.ゴシピィDNAフラグメント;開放矢印は転写方向を示す。

第4図：プラスミドpAG-5。amp:アンピシリン耐性;G418r:（カナマイシン）耐性;ORI:E.coliにおけるプラスミド複製のオリジン;TEF:翻訳延長因子のためのORFを有するA.ゴシピィEcoR I/BamH Iフラグメント;開放矢印は転写方向を示す。

第5図：プラスミドpAG-101。amp:アンピシリン耐性;G418r:G418（カナマイシン）耐性;ORI:E.coli中のプラスミド複製のオリジン;TEF:翻訳延長因子のためのORFを有するA.ゴシピィEcoR I/BamH Iフラグメント;閉鎖矢印:

31

TEF-プロモーター領域を有するA. ゴシビィDNAフラグメント; 開放矢印は転写方向を示す。

第6図: プラスミドpPL1. amp: アンピシリン耐性; M13+ : 一本鎖-DNA-単離のための複製開始点; ori: E.coliにおけるプラスミド複製用オリジン; lacZ: E.coli lacZ遺伝子; PromTEF-プロモーター領域を有する1500bp A. ゴシビィDNAフラグメント

第7図: プラスミドpAG-110. 2μ: 複製開始点を有するS. セレビジアエ2μプラスミドのEcoRIフラグメント; URA3: S. セレビジアエURA3遺伝子; Prom: TEF-プロモーター領域を有する1500bp A. ゴシビィDNAフラグメント; lacZ: E.coli lacZ遺伝子; G418r: G418 (カナマイシン) 耐性遺伝子; ori: E.coliにおけるプラスミド複製用オリジン; amp: アンピシリン耐性遺伝子; 閉鎖矢印: TEF-プロモーター領域を有する1500bp A. ゴシビィDNAフラグメント; 開放矢印は転写方向を示す。

第8図: プラスミドpAG-111. 2μ: 複製開始点を有するS. セレビジアエ2μプラスミドのEcoRIフラグメント; URA3: S. セレビジアエURA3遺伝子; Prom: TEF-プロモーター領域を有する403bp A. ゴシビィDNAフラグメント; lacZ: E.coli lacZ遺伝子; G418r: G418 (カナマイシン) 耐性遺伝子; ori: E.coliにおけるプラスミド複製用のオリジン; amp: アンピシリン耐性遺伝子; 閉鎖矢印: TEF-プロモーター領域を有するA. ゴシビィDNAフラグメント; 開放矢印は転写方向を示す。

第9図: プラスミドpPL2. amp: アンピシリン耐性遺伝子; M13+ : 一本鎖-DNA-単離のための複製開始点; ori: E.coli中のプラスミド複製用のオリジン; lacZ: E.coli lacZ遺伝子; Prom: TEF-プロモーター領域の一部 (270bp) を有する294bp A. ゴシビィDNAフラグメント。

第10図: プラスミドpPL3. amp: アンピシリン耐性遺伝子; M13+ : 一本鎖-DNA-単離のための複製開始点; ori: E.coliにおけるプラスミド複製用のオリジン; lacZ: E.coli lacZ遺伝子; Prom: TEF-プロモーター領域の一部 (215bp) を有する239bp A. ゴシビィDNAフラグメント。

第11図: プラスミドpPL4. amp: アンピシリン耐性遺伝子; M13+ : 一本鎖-DNA-単離のための複製開始点; ori: E.coliにおけるプラスミド複製用のオリジン; lacZ: E.coli lacZ遺伝子; Prom: TEF-プロモーター領域の一部 (134bp) を有する158bp A. ゴシビィDNAフラグメント。

第12図: プラスミドpAG-112. 2μ: 複製開始点を有するS. セレビジアエ2μプラスミドのEcoRIフラグメント; URA3: S. セレビジアエURA3遺伝子; Prom: TEF-プロモ

32

ーター領域を有する294bp A. セレビジアエDNAフラグメント; lacZ: E.coli lacZ遺伝子; G418 (カナマイシン) 耐性遺伝子; ori: E.coliにおけるプラスミド複製用のオリジン; amp: アンピシリン耐性遺伝子; 閉鎖矢印: TEF-プロモーター領域を有するA. ゴシビィDNA断片; 開放矢印は転写方向を示す。

第13図: プラスミドpAG-113. 2μ: 複製開始点を有するS. セレビジアエ2μプラスミドのEcoRIフラグメント; URA3: S. セレビジアエURA3遺伝子; Prom: TEF-プロモーター領域を有する239bp A. ゴシビィDNAフラグメント; lacZ: E.coli lacZ遺伝子; G418r: G418 (カナマイシン) 耐性遺伝子; ori: E.coli中のプラスミド複製用のオリジン; amp: アンピシリン耐性遺伝子; 閉鎖矢印: TEF-プロモーター領域を有するA. ゴシビィDNAフラグメント; 開放矢印は転写方向を示す。

第14図: プラスミドpAG-114. 2μ: 複製開始点を有するS. セレビジアエ2μプラスミドのEcoRIフラグメント; URA3: S. セレビジアエURA3遺伝子; Prom: TEF-プロモーター領域を有する158bp A. ゴシビィDNAフラグメント; lacZ: E.coli lacZ遺伝子; G418r: G418 (カナマイシン) 耐性遺伝子; ori: E.coliにおけるプラスミド複製用のオリジン; amp: アンピシリン耐性遺伝子; 閉鎖矢印: TEF-プロモーター領域を有するA. ゴシビィDNAフラグメント; 開放矢印は転写方向を示す。

第15図: プラスミドpAG-115. 2μm: 複製開始点を有するS. セレビジアエ2μプラスミドのEcoRIフラグメント; URA3: S. セレビジアエURA3遺伝子; lacZ: E.coli lacZ遺伝子; G418r: G418 (カナマイシン) 耐性遺伝子; ori: E.coli中のプラスミド複製用のオリジン; amp: アンピシリン耐性遺伝子; 開放矢印は転写方向を示す。

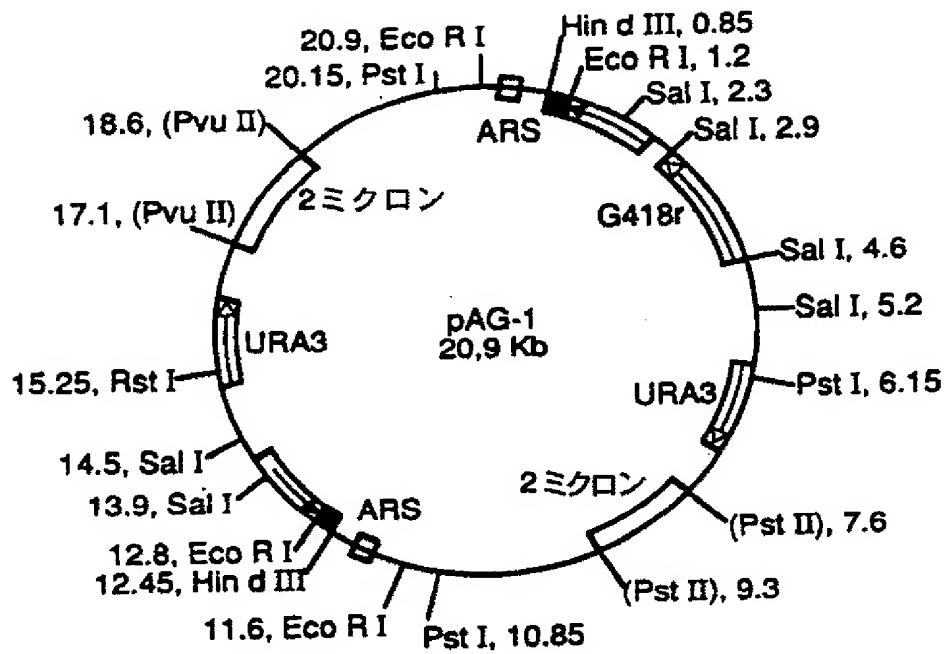
第16図: β-ガラクトシダーゼー表現プラスミドのTEF-プロモーターフラグメント。

第17図: ATG-範囲及びM13PT1、M13PT2、M13PT3、pAG-201、pAG-202、pAG-203のターミネーター範囲におけるヌクレオチド配列。

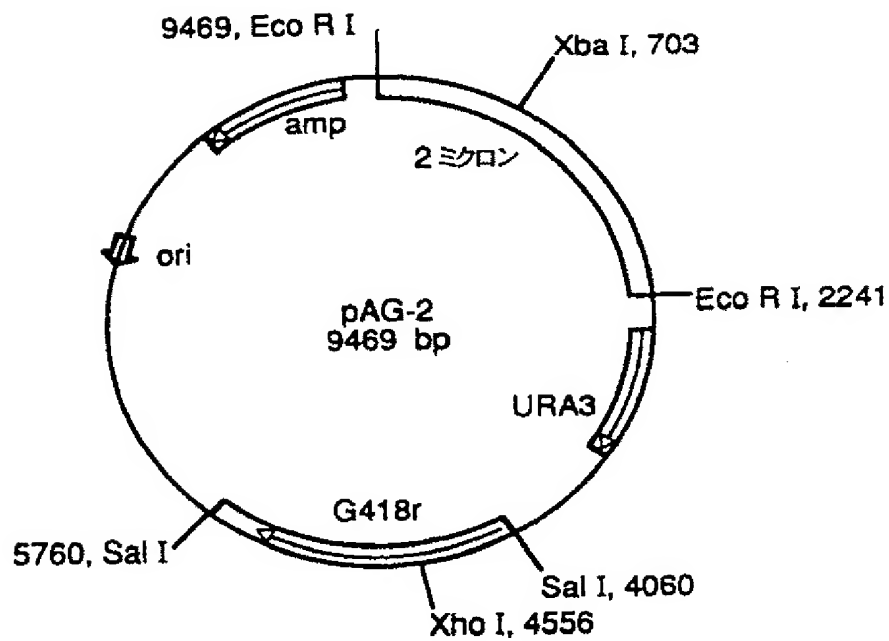
第18図: プラスミドpAG-201、pAG-202、pAG-203. 2μ: 複製開始点を有するS. セレビジアエ2μプラスミドのEcoRIフラグメント; Prom、Term: TEF-プロモーターターミネーター融合を有する751bp A. ゴシビィDNAフラグメント。G418r: G418 (カナマイシン) 耐性遺伝子; ori: E.coliにおけるプラスミド複製用の開始点; amp: アンピシリン耐性遺伝子; 開放矢印は転写方向を示す。

第19図: TEF-遺伝子のプロモーター及びターミネーターからの融合のヌクレオチド配列。

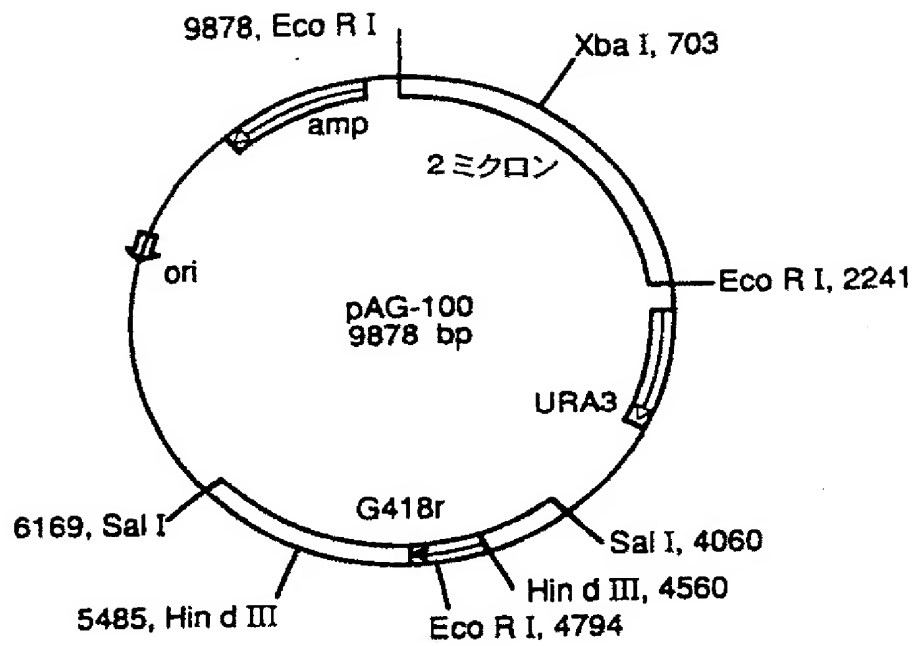
【第1図】



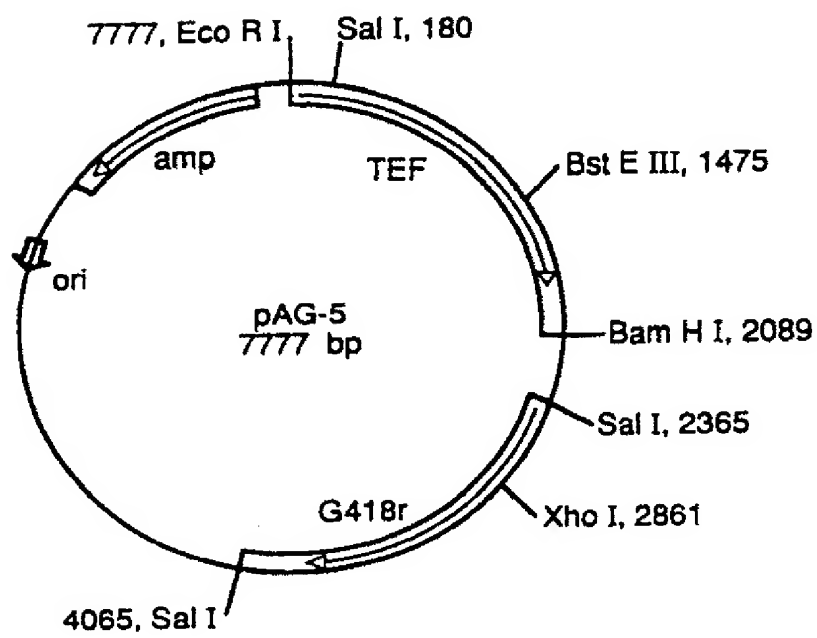
【第2図】



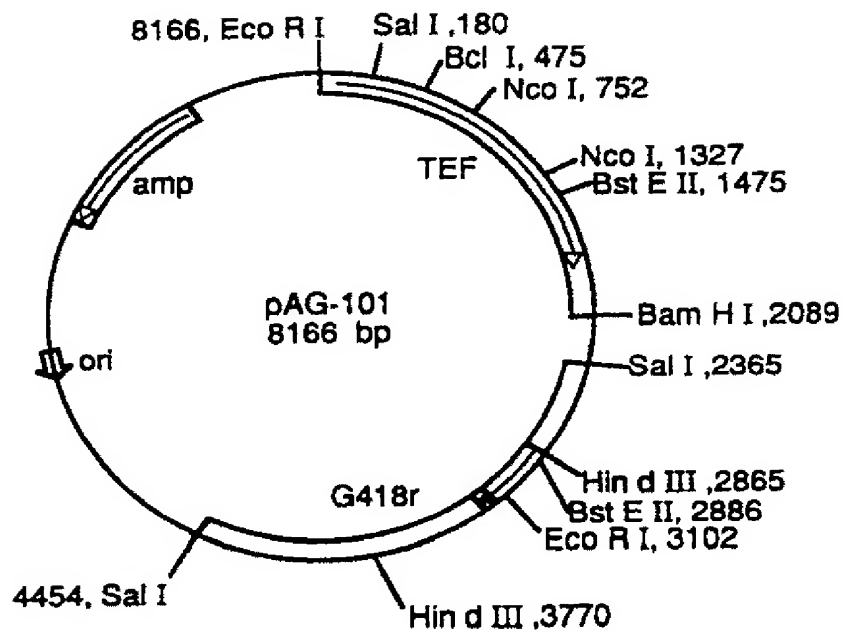
【第3図】



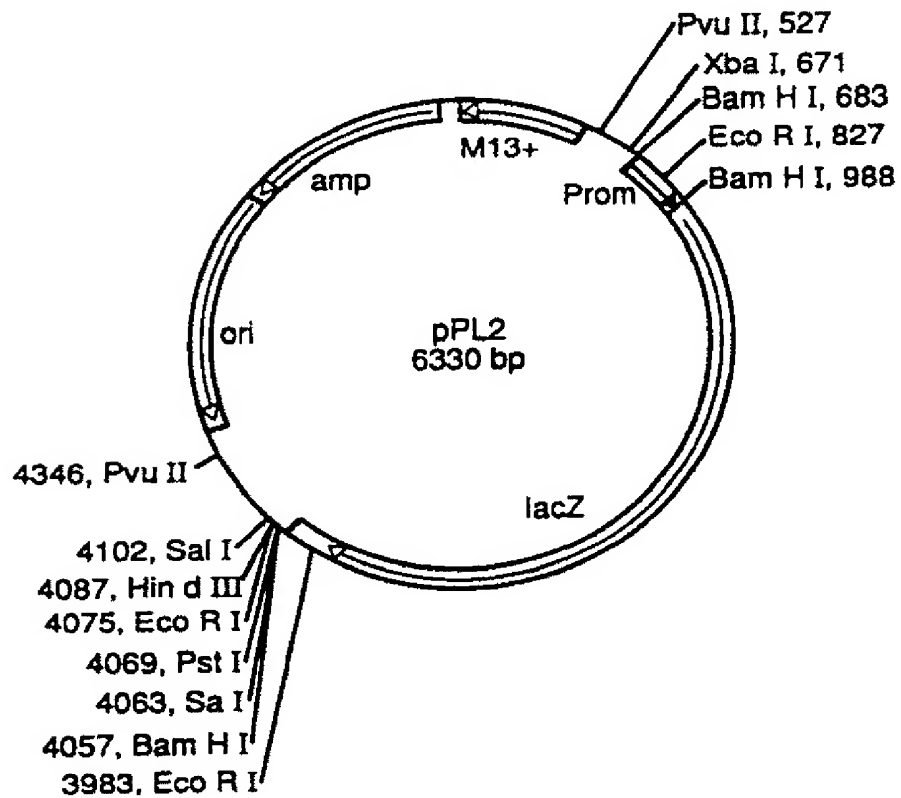
【第4図】



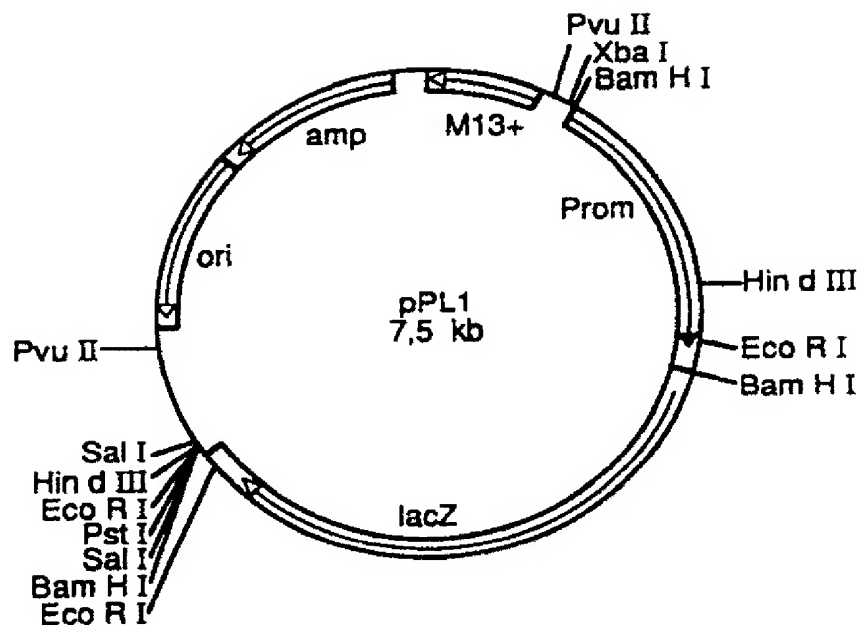
【第5図】



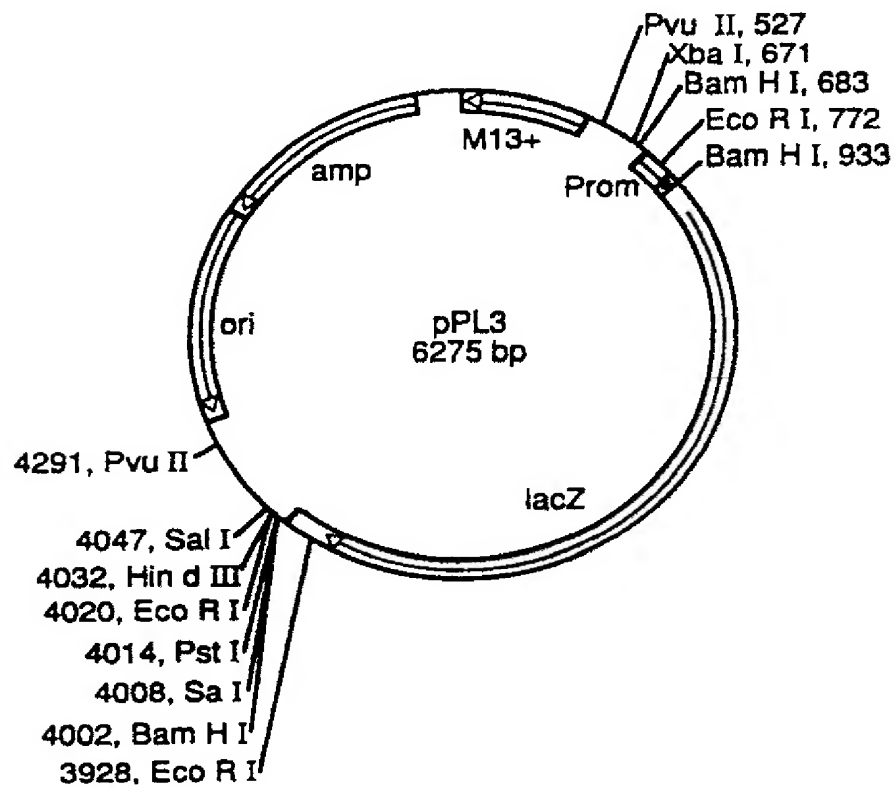
【第9図】



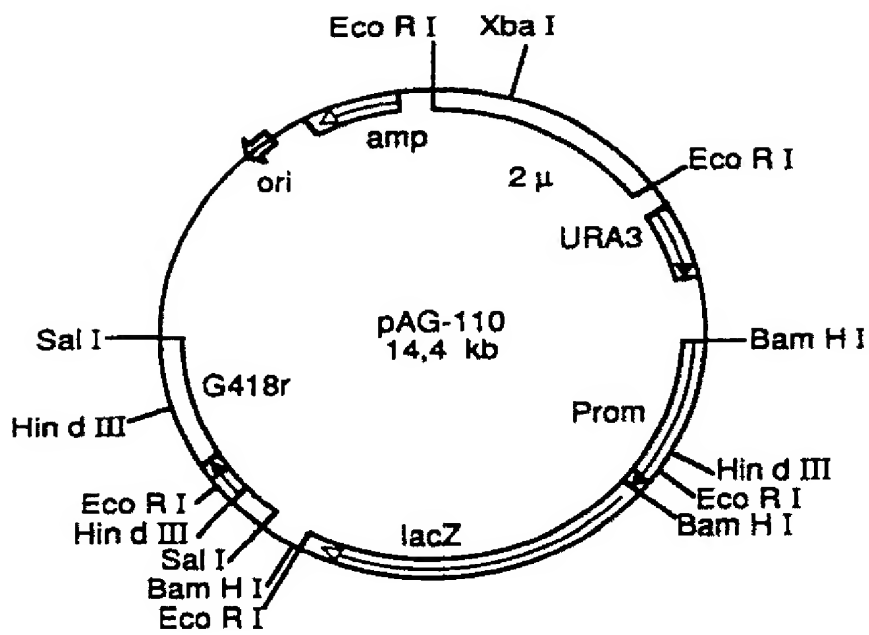
【第6図】



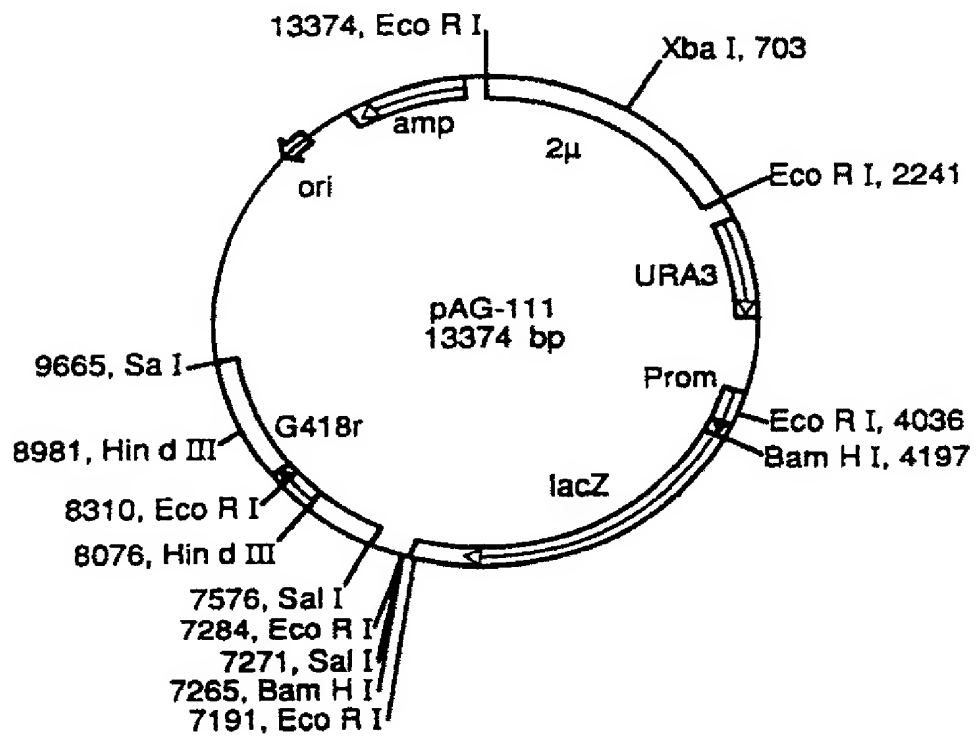
【第10図】



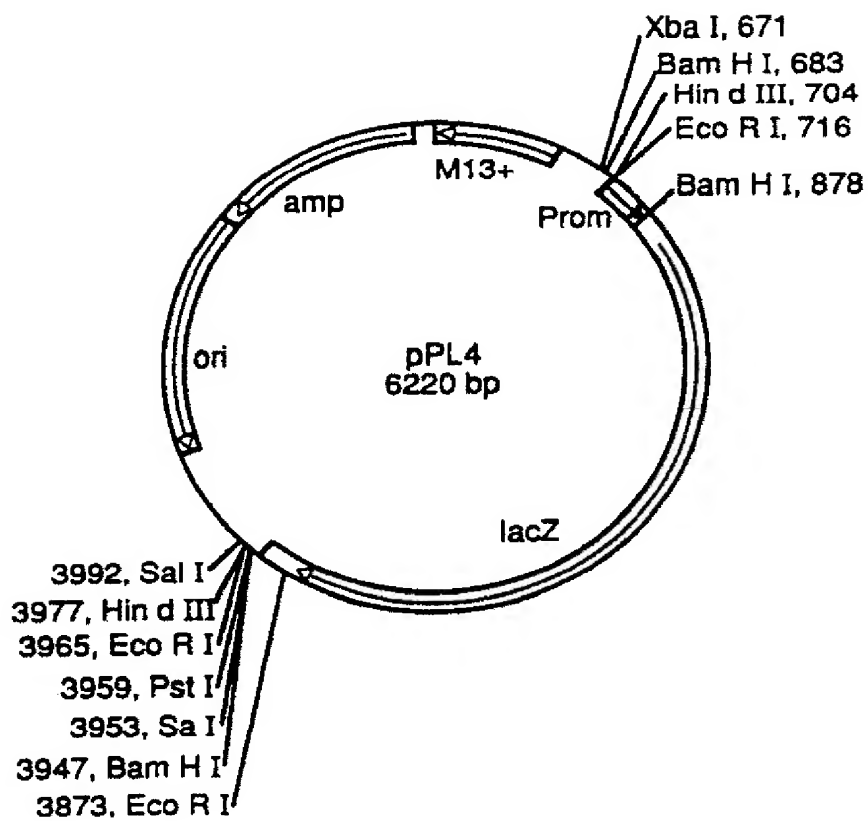
【第7図】



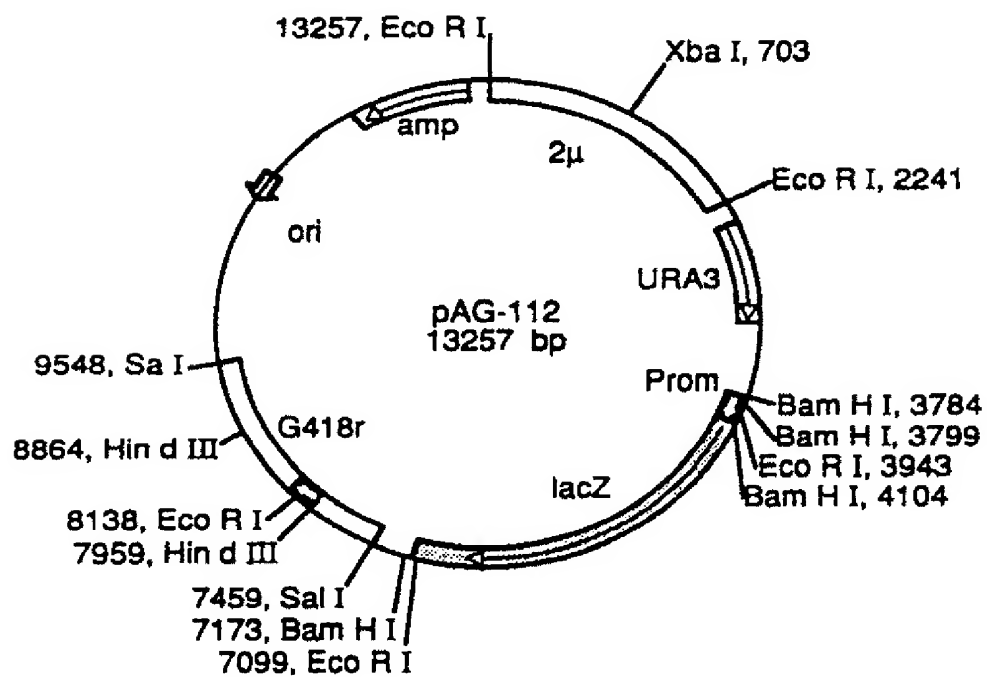
【第8図】



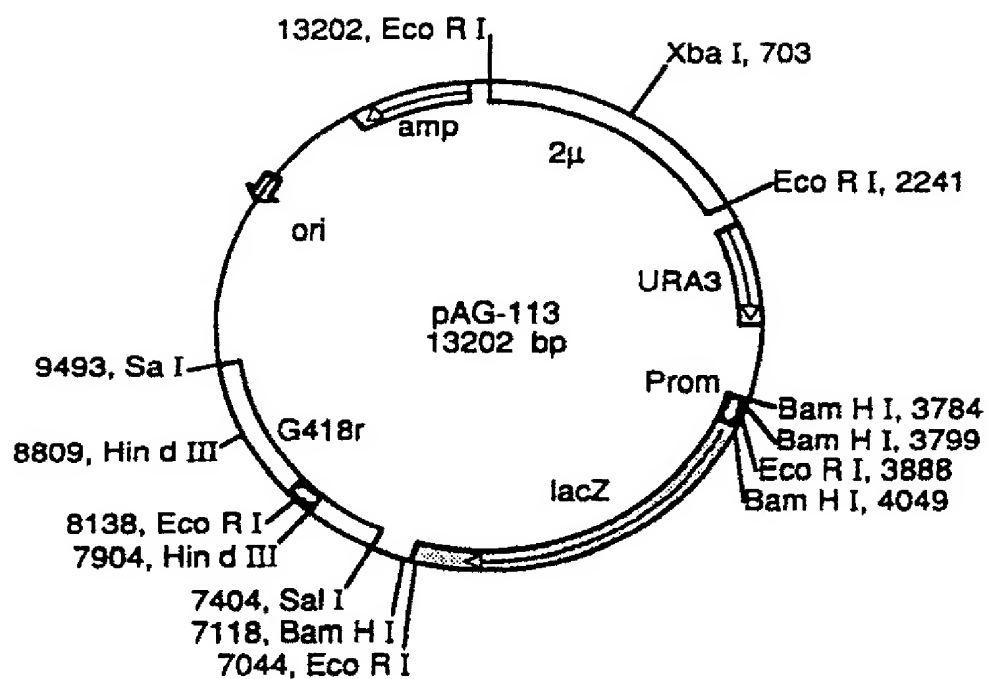
【第11図】



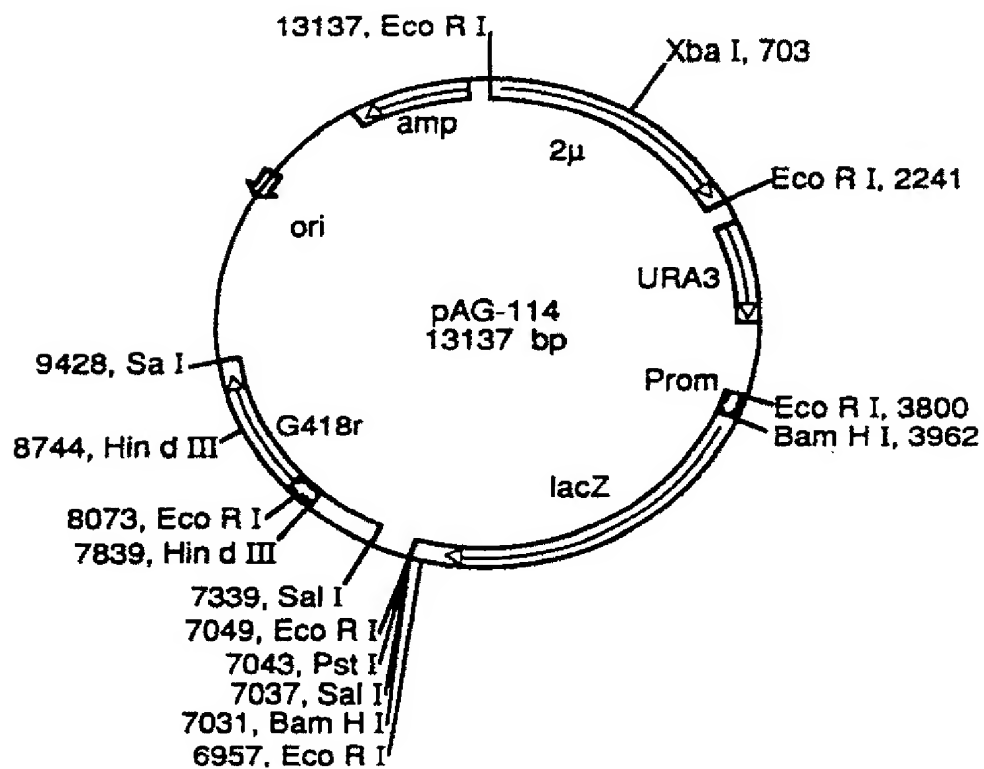
【第12図】



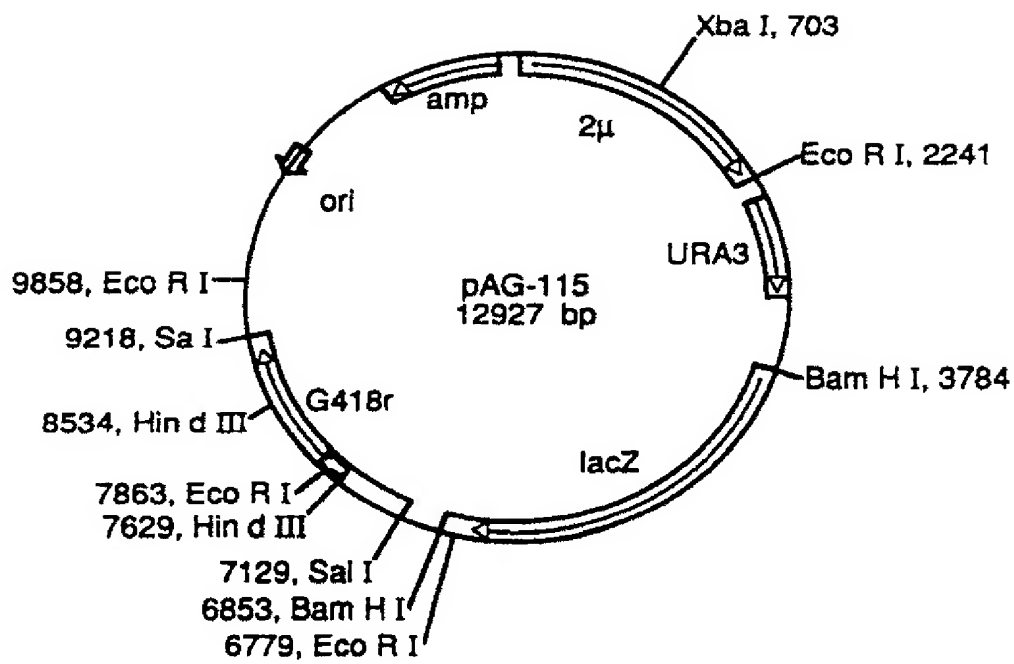
【第13図】



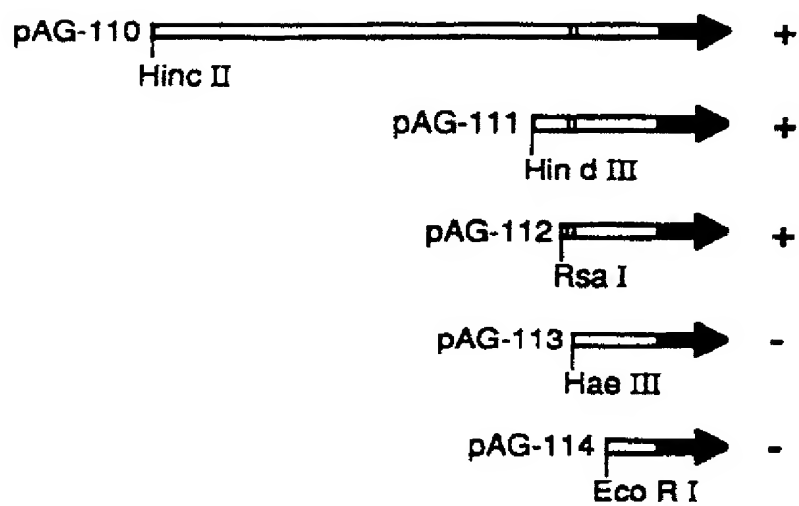
【第14図】



【第15図】



【第16図】



【第17図】

： A T G - 範囲内の突然変異

野生型	CGAACATAAACAAAAATGGGTAAGGAAAAG GCTTGTATTTGTTTTTACCCATTCTTTTC
NcoI - 切断部位	CGAACATAAACAA <u>CC</u> ATGGGTAAGGAAAAG GCTTGTATTTGTT <u>GG</u> TACCCATTCTTTTC
NsiI - 切断部位	CGAACATAAACAAAAATG <u>C</u> ATAAGGAAAAG GCTTGTATTTGTTTTTAC <u>G</u> TATTCTTTTC
SphI - 切断部位	CGAACATAAACAA <u>G</u> CATG <u>C</u> GTAAGGAAAAG GCTTGTATTTGTT <u>C</u> GTA <u>C</u> GATTCTTTTC

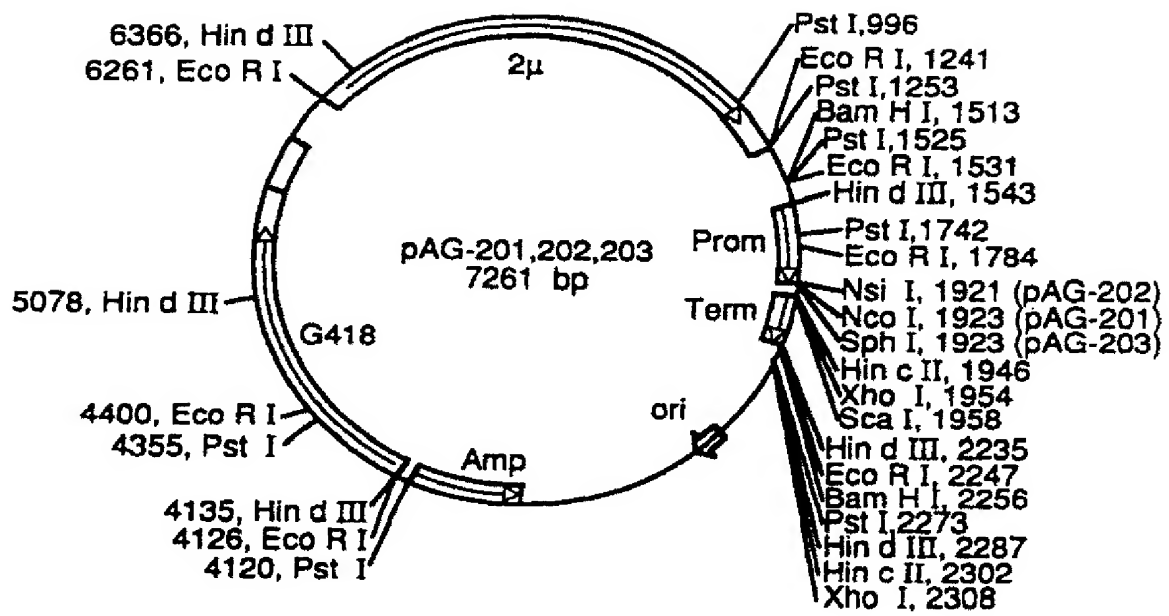
下線を引いたヌクレオチドによる野生型一配列の置換によって A T G - 範囲に新たな切断部位が導入された。

ターミネーター範囲内の突然変異：

野生型	GGCTGGTAAGAAATAGAGTAAGTACTGACAAT CCGACCATTCTTTATCTCATTGACTGTTA
ScaI - 切断部位	GGCTGGTAAGAAATAGAGT ACTGACAAT CCGACCATTCTTTATCTCA TGACTGTTA

A / T - 塩基対の欠失によりターミネーター範囲内に S c a I 切断部位が導入された。

【第18図】



【第19図】

TEF-プロモーター及びTEF-ターミネーターフラグメントよりなる融合

AAGCTTGCCTCGTCCCCGCCGCGGGTCACCCGCCAGCGACATGGAGGCC
HindIII

CAGATACCCTCCTTGACAGTCTTGACGTGCGCAGCTCACGGGGCATGATGT

GACTGTCGCCCGTACATTTAGCCCATACATCCCATGTATAATCATTTGCA

TCCATACATTTTGATGGCCGCGACGGCGCGAAGCAAAAATTACGGCTCCTC

GCTGCAGACCTGCGAGCAGGGAAACGCTCCCCTCAGCAGACGCGTTGAATT
ECORI

CTCCCCACGGCGCGCCCCGTAGAGAAATATAAAAGGTTAGGATTTGCCAC

TGAGGTTCCTTTCATATACCTTCTTTAAATCTTGCTAGGATACAGTT

Start

CTCACATCACATCCGAACATAAACAAAAATGGGTAAGGAAAAGACTCACGT
HincII

Stop

TGACCTGGAGGTCCCGCCCAAAGGCTGGTAAGAAATAGAGTACTGACAA
XhoI ScaI

TAAAAAGATTCTTGTTTTCAAGAACTTGTCATTTGTATAGTTTTTTTATAT

TGTAGTTGTTCTATTTTAATCAATGTTAGCGTGATTTATATTTTTTTTGC

CTCGACATCATCTGCCAGATGCGAAGTTAAGTGCGCAGAAAGTAATATCA

TGCGTCAATCGTATGTGAATGCTGGTCGCTATACTGCTGTGATTGATAC,

TAACGCCGCCATCCAGTGCT

TEF-遺伝子のプロモーター及びターミネーター領域の配列。

TEF-遺伝子の出発コドン及び停止コドンはStart及びStopで示されている。切断部位はプラスミドpAG-201、pAG-202、pAG-203 (第18図)に関連する。

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I
(C 1 2 N 15/09	Z N A	
C 1 2 R 1:645)		

(72)発明者 シュタイナー, ザビーネ
ドイツ連邦共和国 D-6300 ギーセン
ザールラントシュトラッセ 14

(72)発明者 ライト, マーチン シー.
ドイツ連邦共和国 D-7950 ビーベラ
ッハ/リス マルティンールター―シュ
トラッセ13

(58)調査した分野(Int.Cl.⁷, D B 名)
C12N 15/00 - 15/90
C12N 1/00 - 1/38
C12P 1/00 - 41/00
B I O S I S (D I A L O G)
G e n B a n k / E M B L / D D B J (G
E N E T Y X)
W P I (D I A L O G)

DERWENT-ACC-NO: 1991-292976

DERWENT-WEEK: 199140

COPYRIGHT 2008 DERWENT INFORMATION LTD

TITLE: Corrosion-proofed structure of
steel pipe pile comprises tubular
cover layer of polymer contg.
concrete and cement filler
between cover and surface of
steel pipe pile (J6 8.2.86)

INVENTOR: KUSHIDA S

PATENT-ASSIGNEE: OZAWO CONCRETE KOGY[OZAWN] ,
TAISEI CONSTR CO LTD[TAKJ]

PRIORITY-DATA: 1984JP-146725 (July 17, 1984)

PATENT-FAMILY:

PUB-NO	PUB-DATE	LANGUAGE
JP 91059214 B	September 9, 1991	JA
JP 61028630 A	February 8, 1986	JA

APPLICATION-DATA:

PUB-NO	APPL-DESCRIPTOR	APPL-NO	APPL-DATE
JP 91059214B	N/A	1984JP- 146725	July 17, 1984
JP 61028630A	N/A	1984JP- 146725	July 17, 1984

INT-CL-CURRENT:

TYPE	IPC DATE
CIPS	E02D31/06 20060101
CIPS	E02D5/60 20060101

ABSTRACTED-PUB-NO: JP 91059214 B**BASIC-ABSTRACT:**

Corrosion-proofed structure comprises a tubular cover layer made of a polymer-contg. concrete, and cement filler e.g. concrete or mortar charged between the cover layer and outer surface of the steel pipe pile.

USE - Used for constructions at harbours. @ (4pp Dwg. No.0/2)

TITLE-TERMS: CORROSION PROOF STRUCTURE STEEL PIPE
PILE COMPRISE TUBE COVER LAYER
POLYMER CONTAIN CONCRETE CEMENT FILL
SURFACE

DERWENT-CLASS: A93 L02 M14 Q42

CPI-CODES: A12-H02D; A12-R01A; L02-D04D; L02-D07B; L02-J01E; M14-K;

POLYMER-MULTIPUNCH-CODES-AND-KEY-SERIALS:

Key Serials: 0231 2728 2831 2848 3275 3293

Multipunch Codes: 04- 47& 477 489 52& 58& 623 626
647 656

SECONDARY-ACC-NO:

CPI Secondary Accession Numbers: 1991-126970

Non-CPI Secondary Accession Numbers: 1991-224348